

美作大学・美作大学短期大学部紀要  
2012, Vol. 57, 1～7

論 文

# GAD67 の活性に影響を与える食品成分と味覚の伝達との関連 ーハーブに含まれる食品成分の味覚への影響評価ー

Relationship between food ingredients that affect the activity of GAD67 and taste transmission

-Evaluation of the effect of food ingredients in herbs on the taste sensation -

佐々木公子・森本 仁美<sup>1)</sup>・濱野 香里<sup>2)</sup>・植野 洋志<sup>2)</sup>

キーワード：GAD67、GABA、ハーブ、官能試験

## 1. 緒 言

平成 21 年国民健康・栄養調査によると<sup>1)</sup>、40 歳から 74 歳までの年齢層において、男性の 2 人に 1 人、女性では 5 人に 1 人がメタボリック・シンドローム（内臓脂肪症候群）の予備群であるとの報告がある。国は「特定健康診査・特定保健指導<sup>2)</sup>」を導入して、該当者や予備軍に生活改善を促そうとしている。

また、血圧・血中コレステロールなどを正常に保つことを助けたり、お腹の調子を整えるのに役立つなどの特定保健食品や機能性食品の研究・開発も盛んになってきた。たとえば、酢の主成分である酢酸は、血圧を調節したり内臓脂肪の減少に効果があるとか、クエン酸はミネラル吸収を促進するなどの効果が認められる<sup>3)</sup>。しかし、この有機酸の強い「酸味」がおいしさを減じてしまうという問題がある。また、塩分の摂取量は、男女の約 7 割が厚生労働省の 1 日の目標値（男；9g 未満、女；7.5g 未満）を超えており<sup>4)</sup>、塩分の摂り過ぎも大きな問題となっている。しかし、調理や食品加工における味のコントロールには限界があり、おいしさの損失につながりうる。このおいしさを決定する大きな要因として、食品のもつ「味」がある。故に、味を改良することは、健康の維持や生活習慣病の予防・改善と密接に関連しているといえる。

現在、甘味・酸味・苦味・塩味・うま味などの基本

5 味が確認され、これらの味覚はそれぞれの受容体タンパク質を介して神経系に信号が伝達されることで、総合して「おいしさ」として認識される。しかし、この味覚の伝達機構に関して、まだ完全に解明されていないわけではない。

基本 5 味のうち、甘味・苦味・うま味の受容体は、味覚神経と直接シナプス接続していないⅡ型細胞に発現している<sup>5)</sup>。Ⅱ型細胞が受け取ったシグナルの味覚神経への伝達については、ATP 説や味覚神経と接続のあるⅢ型細胞経由説などが提唱されている<sup>6,7)</sup>。

近年、Ⅲ型細胞にグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）が発現して、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）を合成していることが示された<sup>8)</sup>（図 1）。さらに、GABA は GABA<sub>A</sub> 受容体（クロライドイオンチャンネル型）のリガンドであり、GABA<sub>A</sub> 受容体が味蕾に存在することが示されたことにより、GABA の味覚伝達への関

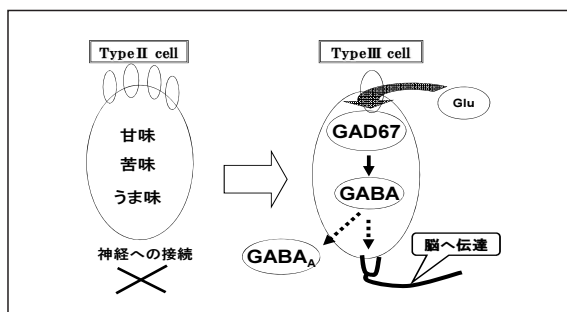


図 1 Type II cell と Type III cell の味覚伝達

美作大学生活科学部食物学科<sup>1)</sup>  
奈良女子大学<sup>2)</sup>

与が示唆された<sup>9)</sup>。

また、酸味の受容体候補遺伝子 (PKD2L1) がⅢ型味蕾細胞に発現して、酸味の受容機構が明らかになりつつある<sup>10)</sup>。

Ⅲ型細胞内での GABA 生産を担う、GAD を介した味蕾細胞内の味覚シグナル伝達機構が明らかになれば、GABA 合成酵素である GAD の活性を阻害したり促進したりすることは、酸味や塩味の味覚情報に直接影響を与えることが考えられる。このような GABA 産生システムの制御が可能ならば、GAD 活性に影響する食品成分を探索し、その食品成分と酸味や塩味のかわりから、味覚を改変する食品成分を同定することも可能かもしれない。

前報 (美作大学・美作大学短期大学部紀要 2011, Vol. 56)<sup>11)</sup> では、官能試験により GABA が塩味と酸味を増強することを報告した。そこで、本研究では、料理に広く使用されているハーブの食品成分のうち、in vitro で GAD67 の活性に影響を与えた水溶性の抽出物が味覚 (酸味) にどのような影響を与えるのかをヒトによる味覚官能検査を用いて調べ、両者の関連性を検討した。

なお、この研究はⅢ型味蕾細胞内において発現している GAD67/GABA と酸味受容との関連性をみるものであるため、対照としてⅡ型味蕾細胞で受容される甘味についても同様の味覚官能検査を行った。

## 2. 方 法

1) 期間: 2011 年 4 月～7 月

2) 対象者: 美作大学食物学科の女子学生  
42 名 (18 歳～22 歳)

3) 環境: 各官能試験は、場所 (調理実習室)・時間帯 (11:00～17:00)・室温 (21～25℃) など、同じ条件で行った。

4) 試薬はナカライテスク(株)、和光純薬(株)、Bio-Rad (株)、Sigma(株) 製の市販特級品を使用し、試薬の溶媒には超純水を用いた。

5) 食品成分の GAD67 活性への影響

(1) 食品成分の抽出及び調製

### ① 食品リスト

官能試験では、ハウス食品株式会社ソマテックセンターより提供していただいた 7 種類 (セロリ celery, シソ perilla, マイカイカ rose rugosa, メース mace, パプリカ paprika, ユズ皮 yuzu peel, カモミール german chamomile) と市販品 10 種類 (ウーロン oolong, レモングラス lemongrass, バジル basil, オレガノ oregano, ペパーミント peppermint, パセリ parsley, アニス anise, クミン cumin, ケシノ実 poppy seed, ジンジャー ginger) の合計 17 種類のハーブを使用した。

### ② 食品成分の抽出法と調製

i. 粉末品 (yuzu peel, celery, perilla, paprika, mace) は、食品重量の 10 倍量の超純水を加えて冷蔵庫で一晩放置後、32 折りにしたろ紙 (110mm ペーパーフィルター) を用いて水溶性成分を自然ろ過したものを食品抽出液とした。

ii. lemongrass は適度に切断し、poppy seed, anise, cumin は乳鉢を用いてすっておき、その他の粉砕物にもそれぞれ、食品重量の 5 倍量の超純水を加えて冷蔵庫で一晩放置した。その後、i と同様に自然ろ過し、抽出水の重量倍率を i と同じにするため、同量の超純水で希釈したものを食品抽出液とした。

iii. 各食品抽出液 5 ml を、乾熱滅菌器 (105℃で 2 時間) で乾燥させた。食品成分抽出液の pH と 1ml あたりの乾燥物量は表 1 の通りである。

### (2) GAD67 酵素液の精製

GAD67 は、奈良女子大学 植野研究室で開発してきた GST 融合タンパク質 GST-GAD67 (Rosetta-gamiB (DE3) pLysS) 発現系を用いて誘導発現を行った。

さらに、菌体破砕後、硫酸アンモニウム分画、アフィニティークロマトグラフィー、トロンビンプロテアーゼ処理によって GAD67 酵素液を精製した。

### (3) 食品成分の GAD67 相対活性比の算出

GAD67 酵素液中のタンパク質 1 mg あたり、食品成分抽出物 (粉末抽出液 100  $\mu$ l、粗みじん切りの抽出液 50  $\mu$ l) を添加した場合と無添加の場合に生成した GABA 量 (反応時間 1 分間あたり) を比較し、食品成分の GAD67 相対活性比 (%) を求めた。

得られた酵素液に含まれるタンパク質量は Bradford 法(Protein Assay 染色液[Bio-Rad (株) 製])に準じ定量した。なお、Standard として BSA(bovine serum albumin) 標準溶液を用いた。

#### (4) GABA 量の測定

GABA量の測定は、基質であるL-glutamateと補酵素である pyridoxal 5'-phosphate (PLP)を含む assay mixture 100  $\mu$ l (0.5M HEPES buffer (pH 7.0), 0.2M L-glutamate (pH7.5), 0.002M PLP)に GAD67酵素液を加え、1000  $\mu$ l になるよう超純水を加えて 37℃で1時間反応させた後、60% PCA 50  $\mu$ lを加えて反応を止めた。ブランクとして、あらかじめ PCA を加えておいたものを 37℃で1時間おいた後、遠心をかけて上清をバイアルに移し、HPLC で GABA 量を測定した。

表1 ハーブと抽出液の内容

試 料	部 位	抽 出 液	
		pH	乾燥重量 mg/ml
oolong tea	葉	5.4	14~17
oregano	葉	6.6	29~37
parsley	葉	5.7	57~60
peppermint	葉	6.3	30~38
poppy seed	種実	6.9	5~7
mace	種皮	4.4	4~6
paprika	果肉	4.9	16~30
yuzu peel	果皮	4.0	15~35
perilla	葉	6.0	17~22
celery	葉・茎	5.5	22~26
ginger	根	6.0	33~40
lemongrass	葉	5.8	15
basil	葉	5.8	8
cumin	種実	5.6	18~24
anise	種実	5.7	18~19
german chamomile	花	5.4	26
rose rugosa	花	4.5	18

#### 6) 官能試験

官能試験の手順は、「おいしさを測る 食品官能試験の実際」<sup>12)</sup> に準じた。

各官能試験は、事前に検査の目的・方法を説明し、内容を十分に理解してもらった上で実施した。

また、本試験は「美作大学 倫理審査委員会」の承認を得て行った。

#### (1) パネルの酸味・甘味の識別能力の確認

パネル (42 名) を対象とし、濃度の異なる 2 つの溶液 (酸味・甘味) を比較し、各味の強い方を判断する 2 点比較法を実施した。

手順

- ① コップの水で口をすすぐ。
- ② A の試料を口に含み、舌の全面に広げながら味わったら、飲み込むか吐き出す。
- ③ コップの水で口をすすぐ。
- ④ B の試料も②～③の手順で比較試験を行う。

[注] 判断に迷う場合は、同じ試料を再度、味わってもよいこと。また、一人ひとり試料の順は変えてあり、試料を入れる容器には 10ml の試験用カップを使用した。酸味・甘味の各試料の濃度は、表 2 に示した。

表2 試料の濃度 (pH)

試 料	A	B
酸味 (酢酸)	0.05% (3.4)	0.01% (3.7)
甘味 (スクロース)	3% (7.4)	2.5% (7.2)

#### (2) 食品成分が酸味および甘味に与える影響

ハーブを中心とした食品成分が酸味に与える影響について、官能試験により検討した。

なお、対照として II 型味蕾細胞で受容される甘味についても同様の官能試験を行った。

酸味として 0.1% 酢酸溶液 (pH3.2)、甘味として 3% スクロース溶液 (pH 7.7) を用いた。食品成分抽出液は、官能試験が可能な濃度 (2 倍希釈) に調整して、約 0.5~1ml ほど口に含んでもらった。

なお、官能試験に用いた食品は、GAD67 活性の探索に使用した食品リストに準じた。

#### ① 0.1%酢酸溶液について

酸味溶液→ハーブ抽出液→酸味溶液の順に飲んでもらい、酸味が「強くなった」「変わらない」「弱くなった」の 3 段階で評価してもらった (使用したハーブは、

表1の oolong tea から rose rugosa までの 17 種類)。

## ② 3%スクロース溶液について

甘味溶液→ハーブ抽出液→甘味溶液の順に飲んでもらい、甘味が「強くなった」「変わらない」「弱くなった」の3段階で評価してもらった(使用したハーブは、表1の oolong tea から anise までの 15 種類)。

### 手順

- i. 酢酸溶液(スクロース溶液)を口に含んで味わった後、飲み込むか吐き出す。
- ii. 口をすすぎ、ハーブを口に含んで飲み込むか吐き出した後、酢酸溶液(スクロース溶液)を口に含み、味わった後、飲み込むか吐き出す。

[注] ハーブ抽出液は 10ml の試験用カップを使用した。酢酸溶液とスクロース溶液は、75 ml のポリエチレンコートの紙コップを使用した。

## 3. 結果及び考察

### 1) 食品成分の GAD67 活性への影響

GAD67 の活性にかかわる食品成分とその相対活性比(%)を図2に示した。

yuzu peel, anise, cumin, celery は GAD67 活性を促進させた。逆に rose rugosa, german chamomile, lemongrass, oolong, oregano, peppermint, prrilla, ginger は GAD67 活性を強く阻害した。また、mace, poppy seed, basil は GAD 活性にほとんど影響を与えなかったことより、食品成分は、GAD67 の活性に影響を与えると示唆された。

### 2) 官能試験

#### (1) パネルの酸味・甘味の識別能力の確認

パネル(酸味:39名 甘味:42名)を対象とし、酸味濃度および甘味濃度について、パネルの濃度差識別能力を確認した。結果(表3)は、2点比較法(片側検定)のための検定表<sup>16)</sup>により検定した。

有意水準 0.1% で、酸味溶液の濃度差 0.04% および甘味溶液の濃度差 0.5% に関して、パネルに識別能力があると判断された。

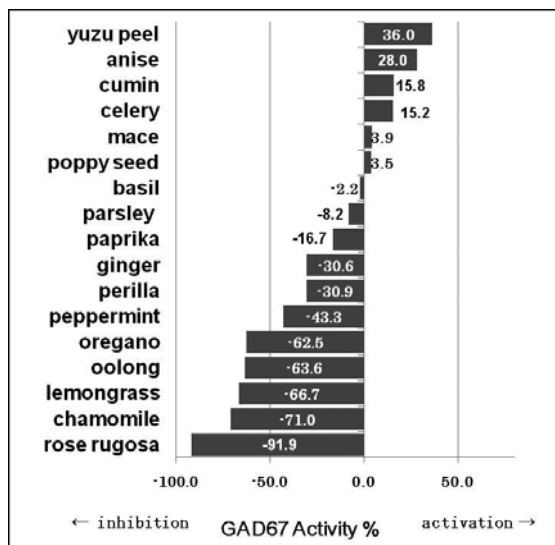


図2 食品抽出物添加時の GAD67 の活性

表3 酸味と甘味の濃度差識別

試料	味が強いと感じた人数
0.01%酸味(酢酸)	0
0.05%酸味(酢酸)	39***
2.5%甘味(スクロース)	2
3%甘味(スクロース)	40***

\*\*\*:有意水準 0.1%

### (2) 食品成分が酸味および甘味に与える影響

ハーブを中心とした食品成分が、酸味および甘味に与える影響について官能試験により検討した。

#### ① 0.1% 酢酸溶液について

酸味溶液→ハーブ抽出液→酸味溶液の順に飲んだ場合の、酸味の強さの変化(「強くなった」「変わらない」「弱くなった」)を評価してもらった。味覚強度が「変わらない」という回答を除き、「強くなった」・「弱くなった」と評価した者で、2点比較法(両側検定)のための検定表<sup>13)</sup>により検定した(表4)。

17種類の食品成分のうち、rose rugosa 抽出液は、有意水準 0.1%で酸味が増強された。mace と celery の抽出液は、有意水準1%で酸味が増強され、parsley と paprika の抽出液は、有意水準 5%で酸味が増強された。

そのほかのハーブ抽出液では有意差はみられなかったが、poppy seed, cumin, anise については、被験者の70%近くが「強くなった」と回答した。

表4 食品成分による酸味強度の変化

試料	パネル数	強くなった	変わらない	弱くなった	検定
oolong tea	39	20	10	9	—
oregano	39	19	7	13	—
parsley	39	23	8	8	*
peppermint	39	15	3	21	—
poppy seed	39	18	13	8	—
mace	39	24	7	8	**
paprika	39	21	10	8	*
yuzu peel	39	18	8	13	—
perilla	39	16	13	10	—
celery	39	22	10	7	**
ginger	39	18	8	12	—
lemongrass	39	16	8	15	—
basil	39	18	6	15	—
cumin	39	22	7	10	—
anise	39	17	14	8	—
german chamomile	39	18	8	13	—
rose rugosa	39	27	5	7	***

\*\*\*: 有意水準 0.1%

\*\* : 有意水準 1%

\* : 有意水準 5%

表5 食品成分による甘味強度の変化

試料	パネル数	強くなった	変わらない	弱くなった	検定
oolong tea	42	23	10	9	*
oregano	42	13	6	23	—
parsley	42	13	12	17	—
peppermint	42	15	9	18	—
poppy seed	42	28	9	5	***
mace	40	26	9	5	***
paprika	40	17	7	16	—
yuzu peel	40	16	7	17	—
perilla	40	16	11	13	—
celery	40	24	9	7	**
ginger	40	17	12	11	—
lemongrass	40	24	10	6	**
basil	40	17	8	15	—
cumin	40	18	10	12	—
anise	40	25	6	9	**

\*\*\*: 有意水準 0.1%

\*\* : 有意水準 1%

\* : 有意水準 5%

本実験では、調理で使用する酢酸濃度として0.1%と設定した。しかし、0.01%酢酸溶液にGABA(0.0025%)を添加した場合、酸味が増強（有意水準 5%）したという

前報<sup>11)</sup>の報告を踏まえて、0.01%での設定も検討すべきであった。

また、抽出液に苦味が強く出たハーブでは、希釈濃度を再検討する必要がある。

## ② 3%スクロース溶液について

甘味溶液→ハーブ抽出液→甘味溶液の順に飲んだ場合の、甘味の強さの変化（「強くなった」「変わらない」「弱くなった」）を評価してもらった。味覚強度が「変わらない」という回答を除き、「強くなった」・「弱くなった」と評価した者で、2点比較法（両側検定）のための検定表<sup>13)</sup>により検定した（表5）。

poppy seed と mace の抽出液は、有意水準 0.1%で甘味が増強された。celery, lemongrass, aniseの抽出液は、有意水準 1%で甘味が増強され、oolong teaの抽出液は、有意水準 5%で甘味が増強された。そのほかのハーブ抽出液では有意差はみられなかったが、ginger と cumin については、被験者の 60%が「強くなった」と回答した。

## （3）GAD67 活性の制御に係わる食品成分と味覚強度の関係

GAD67 活性を制御する食品成分と酸味および甘味との関連を検討するため、官能試験で「強くなった」と評価した者の割合から「弱くなった」と評価した者の割合を引いた値を酸味効力(%)または甘味効力(%)と設定した（表6・7）。

GAD67 相対活性比(%)と酸味（甘味）効力(%)との間に相関性のある食品成分を探索するため、横軸に食品成分の GAD67 相対活性比(%)、縦軸を酸味（甘味）効力(%)として、各食品成分の交点を○で示した。

（図3・4・5）

## ① GAD67 活性を制御する食品成分と酸味との関連

官能試験で使用した全食品成分（17種類）では、GAD67 相対活性比(%)と酸味効力(%)の間には相関は認められなかった（図3）。

そこで、正の GAD67 相対活性比(%)を示した食品成分（poppy seed, mace, yuzu peel, celery, anise, cumin）で解析すると（図4）、GAD67 相対活性比(%)



が高くなると酸味効力(%)が低下する負の相関 ( $R^2=0.55$   $p=0.090$ ) がみられた。また、GAD67 相対活性比(%)が負を示した食品成分では、酸味効力(%)との間には相関性はみられなかった。味蕾において、GAD67 活性は酸味伝達に何らかの影響を与えていると示唆された。

表6 GAD67 活性と味効力（酸味）

試 料	GAD67 活性	味効力
	%	%
oolong tea	-63.6	28.2
oregano	-62.5	15.4
parsley	-8.2	38.5
peppermint	-43.3	-15.4
poppy seed	3.5	25.6
mace	3.9	41.0
paprika	-16.7	33.3
yuzu peel	36.0	12.8
perilla	-30.9	15.4
celery	15.2	38.5
ginger	-30.6	15.8
lemongrass	-66.7	2.6
basil	-2.2	7.7
cumin	15.8	30.8
anise	28.0	23.1
german chamomile	-71.0	12.8
rose rugosa	-91.9	51.3

表7 GAD67 活性と味効力（甘味）

試 料	GAD67 活性	味効力
	%	%
oolong tea	-63.6	33.3
oregano	-62.5	-23.8
parsley	-8.2	-9.5
peppermint	-43.3	-7.1
poppy seed	3.5	54.8
mace	3.9	52.5
paprika	-16.7	2.5
yuzu peel	36.0	-2.5
perilla	-30.9	7.5
celery	15.2	42.5
ginger	-30.6	15.0
lemongrass	-66.7	45.0
basil	-2.2	5.0
cumin	15.8	15.0
anise	28.0	40.0

しかし、食品数が少ないため、さらに食品成分を増やして探索していく必要がある。

## ② GAD67 活性を制御する食品成分と甘味との関連

官能試験で使用した全食品成分（15 種類）では、甘味効力(%)と GAD67 相対活性比(%)の間には相関は認められなかった（図5）。また、正の GAD67 相対活性比(%)を示した食品成分（poppy seed, mace, yuzu peel, celery, anise, cumin）で解析したが、関連はみられなかった。

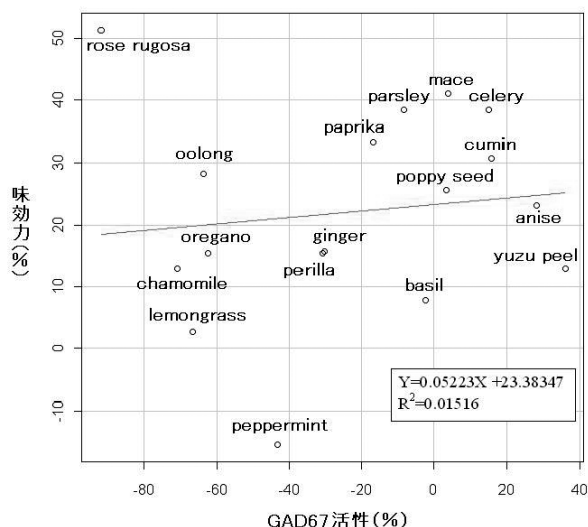


図3 17 成分の GAD67 活性と味効力（酸味）

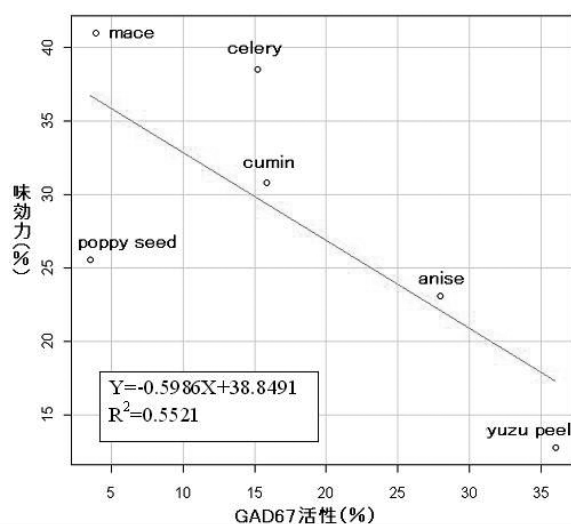


図4 正の GAD67 活性と味効力（酸味）

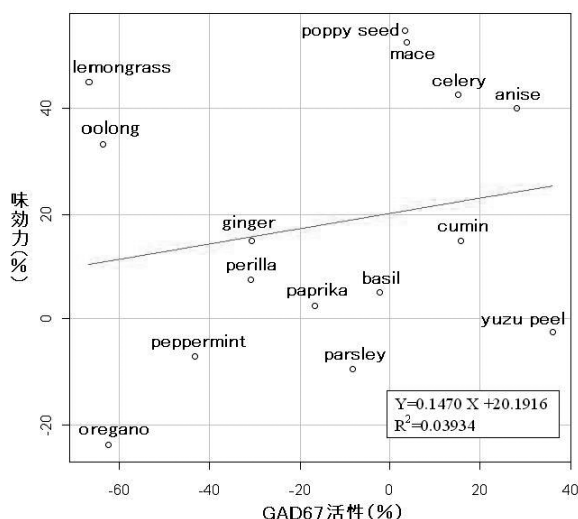


図5 GAD67 活性と味効力（甘味）

#### 4. 要 約

2011 年 4 月から 7 月までの期間に、美作大学食物学科の女子学生を対象として、GABA 合成酵素である GAD67 の活性に影響を与えた水溶性のハーブ抽出物が味覚（酸味）にどのような影響を与えるのかをヒトによる味覚官能検査を用いて調べ、両者の関連性を検討した。

- (1) 17 種類の食品成分のうち、8 種類(rose rugosa, mace, celery, parsley, paprika, poppy seed, cumin, anise) の抽出液は、酸味を増強した。
- (2) 甘味は、8 種類 (poppy seed, mace, celery, lemongrass, anise, oolong tea, ginger, cumin) の食品抽出液によって増強された。
- (3) GAD67 相対活性比(%)が正を示した食品成分 (poppy seed, mace, yuzu peel, anise, cumin, celery) では、GAD67 相対活性比(%)が高くなると酸味効力(%)が低下する負の相関を示した。
- (4) 甘味効力(%)と GAD67 相対活性比(%)の間には、相関はみられなかった。

以上のことより、GAD67 の活性に影響を与える食品成分は、酸味の伝達になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 平成 21 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省
- 2) 特定健康診査・特定保健指導, 厚生労働省
- 3) 特定保健食品, 厚生労働省
- 4) 「日本人の食事摂取基準」(2010 年版), 厚生労働省
- 5) S. Kataoka, R. Yang, Y. Ishimaru, H. Matsunami, J. Seigny, J.C. Kinnamon, and T.E. Finger, The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. Chem. Senses, 33, 243-254, 2008.
- 6) Y. Ninomiya, 食の調節情報としての味覚とおいしさのシグナリング. 化学と生物, 45, 419-425, 2007.
- 7) Y.J. Huang, Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari, S.D. Roper, The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste in mouse taste buds. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 104, 6436-6441, 2007.
- 8) 中村友美, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 渡辺正仁, 植野洋志, GABA is produced in taste bud. 日本味と匂学会誌, 13, 547-550, 2006.
- 9) 中村友美, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 渡辺正仁, 植野洋志, 味蕾細胞における GABA 合成—グルタミン酸の供給と GABA の利用. ビタミン, 82, 387-394, 2008.
- 10) Y. Ishimaru, Y. Katano, K. Yamamoto, M. Akiba, T. Misaka, R. W. Roberts, T. Asakura, H. Matsunami, and K. Abe, Interaction between PKD1L3 and PKD2L1 through their transmembrane domains is required for localization of PKD2L1 at taste pore in taste cells of circumvallate and foliate papillae. FASEB J, 24, 4058-4067, 2010.
- 11) 佐々木公子, 渡辺春奈, 植野洋志, GABA(γ-アミノ酪酸)の味覚への関与について. ～酸味と塩味への関与～美作大学・美作大学短期大学部紀要, 56, 9-14, 2011.
- 12) 古川秀子, 呈味物質の定量的測定 おいしさを測る- 食品官能試験の実際-. 幸書房, 東京, 1997.
- 13) 日本フードスペシャリスト協会 編, 食品の官能評価・鑑別演習. 建帛社, 2008.